

Institut für Veterinärbakteriologie  
der Vetsuisse Fakultät Universität Zürich  
Direktor: Prof. Dr. M. M. Wittenbrink

---

**Enzym-Immunassay und Western Blot zum Nachweis von  
Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* sensu lato  
bei gesunden Pferden**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich

Vorgelegt von  
Katharina May  
Tierärztin  
aus Hohenwestedt (D)

Genehmigt auf Antrag von  
Prof. Dr. med. vet. M. M. Wittenbrink, Referent  
PD Dr. med. vet. Anton Fürst, Korreferent

Zürich 2009

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung .....	3
Summary .....	5
1 Einleitung .....	7
2 Material und Methoden	
2.1 Untersuchte Pferde und Proben.....	11
2.2 <i>Borrelia burgdorferi</i> -Antigen .....	12
2.3 Immunserum gegen <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	12
2.4 Western blot .....	13
2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	14
2.6 Mikroskopischer Agglutinationstest für Leptospirenantikörper .....	16
2.7 Statistische Auswertung.....	16
3 Ergebnisse	
3.1 Immunserum gegen <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	17
3.2 Western blot Analysen .....	17
3.3 Einfluss der Serumabsorption auf die ELISA-Ergebnisse .....	18
3.4 Vergleich von Western blot und ELISA .....	20
3.5 Serologische Untersuchungen an Stuten und Fohlen .....	22
4 Diskussion.....	23
5 Tabellen und Abbildungen .....	30
6 Literatur .....	37
Danksagung .....	42
Lebenslauf .....	43

## **Zusammenfassung**

Für das Pferd ist die pathogene Bedeutung des Erregers der Lyme-Borreliose (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) noch nicht eindeutig geklärt. Die Absicherung der klinischen Diagnose durch den kulturellen Erregernachweis oder die Amplifizierung spezifischer DNA ist beim Pferd nur sehr eingeschränkt möglich. Daher wird zur Bestätigung klinischer Verdachtsdiagnosen auf den Nachweis spezifischer Antikörper im Blutserum zurückgegriffen.

In der vorliegenden Studie wurde Blutserum von 415 gesunden Pferden im ELISA und im Western blot (Wb.) auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* untersucht. Desweiteren wurde die Prävalenz von *B. burgdorferi*-Antikörpern in einem Kollektiv von 54 Stuten-/Fohlenpaaren untersucht. Von den Stuten wurde post partum Blutserum und Kolostrum und von den Fohlen nach der Aufnahme von Kolostrum Blutserum entnommen. Von den Fohlen wurden nach 5-6 Monaten erneut Blutproben entnommen.

Anhand der unterschiedlichen ELISA- und Western blot-Reaktionsmuster konnten die Seroreaktivitäten der 415 gesunden Pferde mit *B. burgdorferi*-Antigenen vier Profilen zugeordnet werden. Profil 1 umfasste 118 Seren (28,4%) ohne jegliche Wb.-Reaktivität; diese Seren wurden als seronegativ eingeordnet. Eine Gruppe von 121 Seren (29,2%, Profil 2) reagierte im Wb. ausschliesslich mit bekannt unspezifischen oder kreuzreagieren *B. burgdorferi* Partialantigenen. Von den 239 Seren der Profile 1 und 2 reagierten 110 (46,0%) im ELISA falsch positiv. Durch Serumabsorption mit einem Gemisch aus kreuzreaktiven heterologen Bakterienantigenen konnte der Anteil der falsch positiven ELISA-Reaktionen signifikant auf 17,1% verringert werden. Profil 3 umfasste 94 Seren (22,6%), die aufgrund ihrer Seroreaktivität mit einem *B. burgdorferi*-spezifischen Partialantigen neben vielfältigen Reaktionen mit

unspezifischen oder kreuzreagierenden Antigenen als verdächtig eingeordnet wurden. In dieser Gruppe hatte die Serumabsorption keinen Einfluss auf den Anteil von ELISA negativen und -positiven Reagenten. Die 82 Seren mit dem Profil 4 (19,8%) wurden aufgrund ihrer Reaktionen mit mindestens 2 *B. burgdorferi*-spezifischen Partialantigenen als seropositiv eingeordnet; dabei reagierten 14 Seren (17,1%) im ELISA falsch negativ. Die ELISA OD-Werte der Seren mit dem Profil 4 waren von den OD-Werten der Profil-3-Seren nicht signifikant verschieden; sie waren jedoch signifikant höher als die OD-Werte der Seren mit den Profilen 1 und 2.

Durch ELISA- und Wb.-Analysen an den Proben der 54 Stuten-/Fohlenpaaren konnte gezeigt werden, dass ein kolostraler Transfer von *B. burgdorferi*-spezifischen Antikörpern von seropositiven Stuten auf ihre Fohlen stattfindet. Die kolostralen *B. burgdorferi*-Antikörper persistieren im Fohlen bis zu 6 Monate.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Seroreaktivität gesunder Pferde gegen *B. burgdorferi* durch eine breite Vielfalt von serologischen Reaktionsmustern charakterisiert ist. Screening Tests wie der ELISA unter Verwendung eines Ganzzell-Antigens erbringen durch Seroreaktionen mit unspezifischen oder kreuzreagierenden *B. burgdorferi*-Antigenen einen hohen Anteil an falsch-positiven Reaktionen. Neugeborene Fohlen können nach einer regelgerechten Aufnahme von Kolostrum ihrer seropositiven Mutter bereits kurze Zeit post partum serologisch positiv reagieren. Um Pferde mit einer *B. burgdorferi*-spezifischen Serokonversion sicher zu identifizieren, ist eine Zweistufen-Diagnostik (ELISA in Kombination mit dem Western blot) unerlässlich. Die Untersuchung von Einzelseren ist für die Diagnostik der equinen Lyme-Borreliose nur von sehr eingeschränkter Relevanz.

## Summary

The pathogenic significance of *Borrelia (B.) burgdorferi*, the causative agent of Lyme borreliosis, in horses is still a subject of debate. Because obtaining definitive proof of *B. burgdorferi* infection through culture isolation or DNA amplification is usually not possible in horses, serologic testing for *B. burgdorferi* antibodies is widely used to confirm clinical diagnosis.

This study summarizes the results of a survey for *B. burgdorferi* antibodies in a sample of 415 clinically healthy adult horses according to a two-step procedure (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA, as first step, followed by Western blot). The principal aim was to gain reliable skills in the interpretation of serological tests when applied on equine sera. In a concomitant survey, we estimated the presence of *B. burgdorferi* specific antibodies in 54 mare and foal pairs, i.e. in mare's blood serum and colostrum, collected after parturition, as well as in the newborn foal's blood serum, following the consumption of colostrum. The foals were serologically screened again 5 to 6 months later.

The large diversity of ELISA- and Western blot reaction patterns from blood serum samples of 415 healthy horses was reasonable assigned to four distinct profiles. A total of 118 sera (28.4%) were classified as negative due to the lack of any Western blot reactivity with *B. burgdorferi* (profile 1). A second panel (121 sera, 29.2%, profile 2) reacted with known unspecific or cross-reactive antigens but failed to exhibit any reaction with *B. burgdorferi*-specific antigens. Out of the 239 sera from profiles 1 and 2, 46.0% (n=110) reacted falsely positive in the ELISA. By serum absorption using a mixture of heterologous cross-reactive bacterial antigens, the rate of false positive ELISA-reactions was significantly reduced to 17.1%. Profile 3 was represented by 94 sera (22.6%) which were classified as equivocal due to their reaction to a single

*B. burgdorferi*-specific antigen aside multiple reactions with known unspecific or cross-reactive antigens. Serum absorption had no impact on the relative proportion of ELISA negative and -positive reagents. The 82 sera of profile 4 (19.8%) were classified as positive due to the recognition of a minimum of 2 *B. burgdorferi*-specific antigens with 14 sera (17.1%) reacting falsely ELISA-negative. ELISA OD values of the profile 4 sera did not differ significantly from those of profile 3 but were significantly higher than OD values of profile 1 and 2.

Serological analyses of 54 mare-/foal-pairs confirmed the passive transfer of *B. burgdorferi*-specific antibodies from seropositive mares to their foals. Colostral antibodies persist in the foal up to 6 months.

In conclusion, healthy horses exhibit a wide variety of serological reactions against *B. burgdorferi*. Screening tests like the ELISA based on whole-cell antigens produce a high proportion of false-positive results due to reactions with unspecific or cross-reactive *B. burgdorferi* antigens. Newborn foals can react seropositive following regular intake of colostrum from a seropositive mare. To identify true seropositive horses, the two-step procedure (ELISA followed by Western blot) is essential. Serological analysis of individual samples is unsuitable to diagnose Lyme borreliosis in horses.

## 1 Einleitung

Hinter dem Taxon *Borrelia* (*B.*) *burgdorferi* steht eine Vielfalt genetisch unterschiedlicher Spirochäten, die in Naturherden v.a. zwischen Kleinnagern und Schildzecken zirkulieren. Verschiedene Schildzecken, in Mitteleuropa primär der gemeine Holzbock, *Ixodes ricinus*, fungieren als Überträger der Borrelien auf eine Vielzahl von Vertebraten, darunter Eidechsen, Vögel und Säugetiere (Eisen et al., 2004).

Durch den Stich infizierter Zecken wird *B. burgdorferi* auf den Menschen übertragen und kann dort Multisystemerkrankungen hervorrufen, die unter dem Begriff Lyme-Borreliose (LB.) zusammengefasst werden. Die LB.-Spirochäten werden derzeit in zwölf anerkannte genetische Gruppen mit Speziesrang (Genospezies) differenziert. Diese Genospezies werden unter der Bezeichnung *B. burgdorferi* sensu lato (sl.) subsumiert (im Folgenden als *B. burgdorferi* bezeichnet). Vier dieser Genospezies, i.e. *B. burgdorferi* sensu stricto (ss.), *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. spielmanii* sind humanpathogen (Kurtenbach et al., 2006; Wang et al., 1999).

Es gibt fundierte Hinweise, dass die Genospezies *B. burgdorferi* ss. - die in Nordamerika vorherrschende Genospezies - beim Menschen einen Tropismus zu den Geweben des Bewegungsapparates besitzt. In Mitteleuropa kommen verschiedene Genospezies vor und beim Menschen ist eine Korrelation zwischen Genospezies und klinischer Manifestation erkennbar. Vertreter der Genospezies *B. garinii* sind offenbar häufiger mit disseminierten Formen oder mit Neuroborreliose assoziiert, während *B. afzelii* signifikant häufiger aus Erkrankungen der Haut wie dem *Erythema migrans* oder der *Acrodermatitis chronica atrophicans* zu isolieren ist. Die pathogene Bedeutung der LB.-Spirochäten für den Menschen ist gesichert. Demgegenüber ist erst in Ansätzen geklärt, welche der bisher bekannten

Genospezies von *B. burgdorferi* bei Haustieren Krankheiten verursachen können. Bislang konnte im Tierexperiment lediglich nachgewiesen werden, dass die Genospezies *B. burgdorferi* ss. für den Hund pathogen und Ursache einer rezidivierenden, häufig zur Selbstheilung neigenden Polyarthrititis ist.

Ein experimenteller Beweis für die Pathogenität von *B. burgdorferi* sl. für das Pferd steht noch aus. Vielfältige, mit der Entdeckung der LB.-Spirochäten im Jahre 1982 induzierte serologische Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass Pferde für die Infektion mit LB.-Spirochäten durch den Stich borrelientragender Schildzecken empfänglich sind. In Deutschland wurden beim Pferd Werte für die Seroprävalenz von bis zu 48% ermittelt (Gerhards und Wollanke, 1996; Käsbohrer und Schönberg, 1990; Liebisch et al., 1999; Venner und Deegen, 1996).

Die serologischen Kriterien zur Diagnose einer Borrelieninfektion beim Pferd sind unzuverlässig. Es kann als gesichert angesehen werden, dass beim Pferd klinisch inapparente Infektionen mit einer Erregerausscheidung im Harn vorkommen. (Manion et al., 1998a). Prospektive Studien am Menschen und an Hunden zeigen, dass die Rate klinischer LB.-Manifestationen bei serologisch gesicherter Infektion gering ist (Fahrer et al., 1998; Levy und Magnarelli, 1992).

Derartige Studien liegen beim Pferd nicht vor und hierdurch wird eine rationale Einschätzung der realen Bedeutung dieser Infektion beim seropositiven Pferd erschwert. Substantielle Indizien für das Vorkommen der LB. beim Pferd sind die signifikante Korrelation zwischen einer deutlich ausgeprägten humoralen Immunantwort und dem Nachweis von *B. burgdorferi* sl.-DNA im Blut bzw. Harn in einem Kollektiv von Pferden mit klinisch definierter Borreliose. Diese Merkmalsverknüpfung war in einem Kontrollkollektiv von gesunden Pferden nicht nachweisbar (Manion et al., 1998b).



Im Verlauf der experimentellen Infektion von Ponies durch borrelientragende Zecken konnten erste Erkenntnisse über die Pathogenität der Genospezies *B. burgdorferi* ss. für das Pferd gewonnen werden. Die Tiere zeigten Serokonversion. Trotz persistierender Infektion waren über den Beobachtungszeitraum von neun Monaten bis auf minime Hautläsionen keine Krankheitserscheinungen und post mortem keine pathologischen Veränderungen in infizierten Organen nachweisbar (Chang et al., 2000a). In aktuellen Fallberichten aus Deutschland wird eine generalisierte chronische LB. bei Pferden und die routinemässige schnelle Anzüchtung von Borrelien (teilweise in 24 h) aus intra vitam- und post mortem entnommenen Organproben beschrieben (Liebisch et al., 1999). Diesen Fallberichten zufolge bleibt eine *Borrelia*-Infektion des Pferdes möglicherweise unerkannt, weil Untersuchungslaboratorien v.a. aufgrund von insuffizienten Kultivierungsverfahren nicht in der Lage sind, einen Erregernachweis zu führen (Liebisch et al., 1999). Eine Reihe von Fallberichten zum Nachweis von *B. burgdorferi* bei Pferden mit Syndromen, die klinisch mit auffälligen Symptomen der LB. des Menschen übereinstimmen sowie etliche Berichte über den Nachweis einer Korrelation zwischen dem Auftreten dieser Syndrome und einer spezifischen Serokonversion bilden bis heute die Grundlage dafür, dass die equine LB. differentialdiagnostisch als relevante klinische Entität angesehen wird (Butler et al., 2005; Venner und Deegen, 1996). Dieser Auffassung stehen allerdings die Resultate neuerer seroepidemiologischer Studien sowie die Ergebnisse tierexperimenteller Arbeiten entgegen (Chang et al., 2000 a, b; Chang et al., 2005; Egenvall et al., 2001).

Trotz dieser divergierenden Auffassungen stellt die LB. weiterhin eine klinisch relevante Differentialdiagnose dar, die insbesondere bei Pferden mit chronischer Leistungsdepression, Arthritis/Polyarthritis und Lahmheiten sowie neuronalen

Störungen gestellt wird (Gall und Pfister, 2006, Johnson et al., 2008, Schönert et al., 2008). Zur ätiologischen Absicherung dieser Diagnosen wird gewöhnlich der Nachweis von Antikörpern herangezogen. Allerdings ist insbesondere bei Spirochätosen der Antikörpernachweis mit verschiedenen Problemen, insbesondere dem der relativ geringen Spezifität behaftet. Vor dem Hintergrund der hohen anti-*B. burgdorferi*-Seroreaktivität in klinisch gesunden Pferden haben serodiagnostische Verfahren wie der ELISA oder der IFT lediglich eine unzureichende diagnostische Validität (Barbour, 1992; Cohen et al., 1988; Müller et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden Blutserumproben von 415 klinisch gesunden Pferden in einer Zwei-Stufen-Serodiagnostik auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* untersucht (1. Schritt: ELISA; 2. Schritt: Western Blot; Wilske, 2005). Ziel war die Festlegung von Bewertungskriterien für die genannten serologischen Tests zur Anwendung beim Pferd. In einer weiteren Studie wurden 54 Stuten-/Fohlen-Paare auf *B. burgdorferi* spezifische Antikörper untersucht. Hierzu wurde von den Stuten nach dem Abfohlen Blut- bzw. Kolostrumproben entnommen. Von den neugeborenen Fohlen wurden nach der Aufnahme von Kolostrum ebenfalls Blutproben entnommen. Von den Fohlen wurden nach etwa sechs Monaten erneut Blutproben genommen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Untersuchte Pferde und Proben

Von 2005 bis einschliesslich 2007 wurden Blutserumproben von insgesamt 415 Pferden beiderlei Geschlechts, unterschiedlicher Rassen und unterschiedlichen Alters gesammelt. Die Proben stammten aus Bayern (n=284) und aus Hessen (n=131). Alle Pferde waren nach den Angaben der betreuenden Tierärzte klinisch gesund. Die Serumproben wurden aliquotiert und bei -20°C bis zur Untersuchung aufbewahrt.

In die Studie wurden desweiteren 54 Stuten mit Fohlen bei Fuss einbezogen. Die Stuten gehörten verschiedenen Rassen an und stammten aus der Region Möttingen in Nordbayern. In dieser Region findet sich der Hauptvektor der LB., *I. ricinus*, und die Pferdebesitzer berichteten auf Nachfrage über einen saisonalen Zeckenbefall der Pferde. Über einen 18-Monatszeitraum, von April 2004 bis Oktober 2005 wurden von den Tieren Proben gesammelt. Das Alter der Stuten zum Zeitpunkt des Abfohlens lag zwischen 3 und 19 Jahren ( $8,7 \pm 4,4$  Jahre, arithmetischer Mittelwert  $\bar{x} \pm$  Standardabweichung s). Alle Geburten sind normal verlaufen. Bei Studienbeginn bzw. der ersten Probennahme wurde an allen Tieren eine klinische Untersuchung durchgeführt, derzufolge die Stuten und Fohlen klinisch gesund und in guter Verfassung waren. Da zur Probenentnahme die Einwilligung bzw. Mitwirkung der Tierbesitzer erforderlich war, erfolgte die erste Probennahme jeweils an verschiedenen Zeitpunkten nach der Geburt, jedoch stets nach der Erstaufnahme von Kolostrum durch die Fohlen. Die Erstproben wurden innerhalb von 2 Tagen nach der Geburt entnommen ( $1,1 \pm 0,3$  d). Nachfolgeproben wurden von allen 54 Fohlen im 6. Lebensmonat ( $5,6 \pm 1,1$  Monate) entnommen. Blutproben wurden unter

aseptischen Bedingungen durch Venenpunktion in Vacutainer Röhrchen (Becton Dickinson) genommen. Nach Gerinnung wurden das Serum durch Zentrifugation abgetrennt (10 min, 800 x g). Analog wurde aus entnommenen Milchproben das Milchserum gewonnen. Die Proben wurden aliquotiert und bis zur Untersuchung bei -20°C gelagert.

## **2.2 *Borrelia burgdorferi*-Antigen**

Die Referenzstämme *B. burgdorferi* sensu stricto (ss) B31 (ATCC 35210), *B. garinii* N34, *B. afzelii* VS461 und *B. valaisiana* VS116 wurden bei 34°C in BSK-II-Medium unter Zusatz von 6% hitzeinaktiviertem Kaninchenserum vermehrt (Barbour, 1984). Aus Log-Phase Kulturen der vier Genospezies gewonnene und mehrfach gewaschene dichte Suspensionen in PBS wurden *ana partes aequales* gemischt (Lowry et al., 1951) und bei -80°C aufbewahrt.

## **2.3 Immunserum gegen *Borrelia burgdorferi***

Ein polyklonales anti-*B. burgdorferi* Hyperimmunserum wurde durch Immunisierung einer 8-jährigen gesunden Warmblutstute gewonnen. Die Stute wurde aufgrund ihres hinsichtlich *B. burgdorferi* seronegativen Status ausgewählt: im ELISA und Western blot reagierten die Präimmunisierungsseren negativ. Die Immunisierung wurde entsprechend den einschlägigen Regularien der Bezirksregierung Oberbayern an der Klinik für Pferde der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Grundlage des Antigens war ein Gemisch der vier häufigsten europäischen Genospezies von *B. burgdorferi* sl. (*B. burgdorferi* ss., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*), hergestellt wie in Abschnitt 2.2 beschrieben. Am Tag 1 wurden dem Pferd 2,0 ml Antigen intramuskulär (i.m.) injiziert. Das Antigen bestand aus 0,2 mg

*B. burgdorferi*-Protein im Verhältnis 1:1 [v/v] mit komplettem Freund'schen Adjuvans (Sigma, Buchs, Schweiz) gemischt. Am Tag 22 wurde das Pferd mit der gleichen Antigendosis, diesmal aber in Mischung mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans (Sigma) i.m. immunisiert. Insgesamt wurden acht Chargen von Blutproben durch Punktion der Jugularvene genommen, nämlich zwei Chargen vor Beginn der Immunisierung (Tag -7; Tag 1, unmittelbar vor der im.-Injektion des Antigens, Abbildung 1), am Tag 8, 14 und 22 (unmittelbar vor der Booster Immunisierung) und am Tag 29, 36, und 43. Das Blutserum wurde nach der Gerinnung durch Zentrifugation abgetrennt, aliquotiert und bei -20°C bis zur Untersuchung gelagert.

## **2.4 Western blot**

Für den Nachweis von equinen IgG-Antikörpern gegen *B. burgdorferi*-spezifische Partialantigene wurde der kommerziell erhältliche *B. burgdorferi*-IgG/IgM Western Blot (Wb.) (Institut Virion, Rüschlikon, Schweiz) modifiziert. Optimale Serum- und Konjugat-Verdünnungen wurden durch systematische wiederholte Untersuchungen von Verdünnungsreihen des Konjugates (Alkalische-Phosphatase-konjugiertes Ziege-anti-Pferd IgG (H+L; KPL, Maryland, USA) gegen seriell verdünnte positive und negative Kontrollseren vom Pferd ermittelt. Für den Nachweis eines deutlichen *B. burgdorferi*-spezifischen Bandenmusters entsprechend den Herstellerangaben erwies sich eine Serumverdünnung von 1:200 und eine Konjugatverdünnung von 1:10.000 als optimal. Ansonsten wurde der Test strikt nach den Herstellerangaben durchgeführt. Vor der Untersuchung wurden die Kontrollseren, Blut- und Milchseren über Nacht bei 4°C mit Suspensionen aus gewaschenen und formalininaktivierten (ca.  $10^9$  Bakterien/ml) *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Leptospira (L.) interrogans* and *L. borgpetersenii* zur Absorption kreuzreagierender Antikörper

inkubiert (Wittenbrink et al., 1996). In jedem Wb.-Ansatz wurden ein positives Kontrollserum von dem immunisierten Pferd, ein negatives Kontrollserum, die testinterne cut-off Kontrolle und die Konjugatkontrolle (ohne Serum) mitgeführt. Die Auswertung der Wb.-Muster erfolgte unter Verwendung des chargenspezifischen Standards zur Lokalisierung der Antigenbanden streng nach den Vorgaben des Herstellers. Bei der Beurteilung der Wb.-Reaktionen als positiv oder negativ diente die cut-off-Kontrolle als Standard. Wb.-Reaktionen wurden als positiv bewertet, wenn eine Probe mit mindestens 2 der 13 *B. burgdorferi* spezifischen Antigene reagierte (18, 19, 21, 22, 25, 29, 30, 31, 34, 39, 45, 58, und 83 kDa). Reaktionen mit kreuzreagierenden Antigenen wie z.B. den 75 und 60 kDa Hitzeschockproteinen (hsp) oder dem 41 kDa Flagellin blieben bei dieser Bewertung unberücksichtigt.

## **2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay**

Der ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* wurde nach den Methoden von Voller und Bidwell (1986) durchgeführt. Die Antigenkonzentration sowie die Serum- und Konjugatverdünnungen wurden unter Anwendung von Standardverfahren optimiert (Crowther, 2001).

Alle Seren wurden vor der Untersuchung im ELISA absorbiert wie in Abschnitt 2.4 beschrieben. Vor jedem Test wurde ein Aliquot des ELISA-Antigens aufgetaut und durch Ultraschall gründlich homogenisiert (siehe Abschnitt 2.2).

Mikrotiterplatten (Microton 655001, Greiner bio one, Nürtingen, Deutschland) wurden über Nacht bei 4°C mit Antigen (f.c. 350 ng/mL) in Karbonat-Bikarbonat Puffer (15,0 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 34,9 mM NaHCO<sub>3</sub>; 3,1 mM NaN<sub>3</sub>; pH 9,6) beladen (100 µl/Kavität). Als Wasch- und Verdünnungsflüssigkeit diente PBS pH 7,4 mit Zusatz von 0,05% TWEEN 20 und 1,0% Proteose Pepton (Difco No. 3, Brunschwig, Basel, Schweiz).

Die Platten wurden entleert und dreimal in einem automatischen Waschgerät (Tecan, Maennedorf, Schweiz) gewaschen. Die weiteren Inkubationen der Mikrotiterplatten erfolgten bei Raumtemperatur 1 h auf einem Schüttler mit ca. 200 U/min. Nach jeder Inkubation wurden die Platten dreimal gewaschen. Die Absättigung freier Bindungsstellen erfolgte mit Blockingpuffer (PBS + 1,0% Proteose-Pepton; 200 µl/Kavität; 1 h Inkubation). Die Testseren wurden 1:200 verdünnt und jeweils im Doppelansatz getestet (100 µl/Kavität). Zur Detektion gebundener Antikörper wurde Meerettichperoxidase-konjugiertes Ziege-anti-Pferd-IgG (H+L) (Sigma) in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet (100 µl/Kavität).

Gebundene Enzymaktivitäten wurden über den Umsatz von ABTS (2,2-Azino-di [3-ethly-Benzthiazolinsulfat], Sigma) in 0,1 M Zitratpuffer pH 4,2 + 0,03% (vol/vol) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachgewiesen (100 µl/Kavität). Der Substratumsatz wurde bei 405 nm in einem computergesteuerten Mehrkanalphotometer gemessen (Tecan). Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 2,0 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 µl/Kavität) abgebrochen, nachdem der Substratumsatz der Positivkontrollen eine optische Dichte (OD<sub>405</sub>) von 0,8-1,0 erreicht hatte (Ø 25-30 min Inkubation).

Die erste Vertikalreihe jeder Mikrotiterplatte enthielt nur Substrat (Blank-Reihe). Des weiteren wurden Serumkontrollen (ohne Antigen) und Antigen-Konjugatkontrollen durchgeführt. Als Positiv- bzw. Negativkontrollserum wurden auf jeder Mikrotiterplatte das Serum des immunisierten Pferdes und jeweils sieben aus einem Pool von 30 seronegativen Pferden willkürlich ausgewählte Seren in der 1:200-Verdünnung im Doppelansatz mitgeführt.

Die Berechnung des Grenzwertes (cut-off) erfolgte aus den Messwerten der seriellen Untersuchungen der Negativkontrollseren nach der Methode von Tjissen (1985) auf dem Signifikanzniveau von  $p < 0.01$ . Die Präzision des ELISA wurde durch

Berechnung der Intra- und Interassayvarianz aus ELISA-Daten des positiven Kontrollserums ermittelt (Chan und Perlstein, 1987).

## **2.6 Mikroskopischer Agglutinationstest für Leptospirenantikörper**

Willkürlich ausgewählte Seren wurden im Mikroskopischen Agglutinationstest (MAT) gemäss Standardverfahren auf Antikörper gegen Leptospiren untersucht (OIE, 2006). Insgesamt zehn Serovaren (sv.) wurden als Antigen verwendet: *L. interrogans* sv. *australis*, *autumnalis*, *bataviae*, *bratislava*, *canicola*, *grippotyphosa*, *hardjo*, *icterohaemorrhagiae*, und *pomona* sowie *L. borgpetersenii* sv. *tarassovi*.

## **2.7 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung des Datenmaterials auf Unterschiede und Zusammenhänge wurde das Statistikprogramm SigmaStat<sup>®</sup>, Version 3.0 verwendet (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung zwischen Gruppen wurden durch den *Chi*-Quadrat Test analysiert. Der Vergleich von Medianen erfolgte durch den Kruskal-Wallis-Test. Bei Normalverteilung wurde der *t*-Test angewendet. Die grafische Darstellung der Resultate erfolgte unter Verwendung des Grafikprogrammes OriginLab<sup>™</sup> Version 7.5 (OriginLab Corp. Northampton, MA, USA).



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Immunserum gegen *Borrelia burgdorferi*

Im Blutserum des immunisierten Pferdes waren 14 Tage nach der Erstimmunisierung im ELISA *B. burgdorferi*-spezifische positive Reaktionen nachweisbar. Der zu Beginn moderate, nach der Booster-Immunsierung am 22. Tag rapide und starke Anstieg der *B. burgdorferi*-spezifischen ELISA-Reaktivität ging einher mit der Entwicklung einer nachhaltigen Serokonversion im Western blot (Wb.). In den Präimmunisierungsseren waren im ELISA und Wb. keine spezifischen Antikörper nachweisbar. Demgegenüber wies das Blutserum vom 29. Tag nach Erstimmunisierung (Tag 7 nach Booster-Immunsierung) im Wb. deutliche spezifische Reaktionen mit mindestens 13 *B. burgdorferi* Antigenen auf (Abbildung 1). Die Prä- und Postimmunisierungsseren des Pferdes waren somit als Kontrollseren zur Etablierung des ELISA und zur Adaptation des kommerziellen Wb. für die Untersuchung von Pferdeserum geeignet.

#### 3.2 Western blot Analysen

Die Wb.-Analyse der Seren von den 415 gesunden Pferden ergab eine hohe Diversität an Reaktionsmustern, die insgesamt vier Gruppen (Profilen) zugeordnet werden konnten. Eine Gruppe von 118 Seren (28,4%) wies keine Wb.-Reaktionen auf (Wb.-Gruppe 1, Tabelle 1). In Abbildung 2 sind die kumulativen Häufigkeiten der Wb.-Reaktionen der Wb.-Gruppen 2-4 mit den verschiedenen *B. burgdorferi*-Partialantigenen dargestellt.

Wb.-Gruppe 2 besteht aus 121 Seren (29,2%, Tabelle 1). Ein gemeinsames Merkmal der Seren aus Wb.-Gruppe 2 ist das Fehlen jeglicher Reaktivität mit den

*B. burgdorferi*-spezifischen Partialantigenen. Mit einer Rate von 96.7% (n=117) weist Gruppe 2 eine ausgeprägte Seroreaktivität mit dem 41 kDa Flagellin auf, die ergänzt wird durch eine deutliche Seroreaktivität mit dem hsp60 Hitzeschockprotein in 34 Seren (28,1%).

Wb.-Gruppe 3 besteht aus 94 Seren (22,6%, Tabelle 1). Neben den deutlichen Reaktionen mit dem 41 kDa Flagellin in 58 Seren (61,7%) und den Hitzeschockproteinen hsp60 bzw. hsp75 (27 Seren, 28,7%) waren in den Seren Reaktionen mit verschiedenen, *B. burgdorferi*-spezifischen Antigenen nachweisbar. Jedes Serum reagierte allerdings nur mit jeweils einem spezifischen Antigen.

Wb.-Gruppe 4 umfasst 82 Seren (19,8%), die mit mindestens zwei *B. burgdorferi* spezifischen Partialantigenen reagierten. Daneben waren Reaktionen mit dem 41 kDa Flagellin und den hsp60/hsp75-Hitzeschockproteinen nachweisbar.

### **3.3 Einfluss der Serumabsorption auf die ELISA Ergebnisse**

Mit den OD-Werten der 118 Wb.-negativen Seren (Wb.-Gruppe 1, Tabelle 1) wurde der cut-off für die Auswertung der ELISA-Daten der 415 Seren von gesunden Pferden ermittelt. Für unbehandelte Seren errechnete sich ein cut-off von 0.273 ( $p < 0.001$ ). Für absorbierte Seren betrug der Wert 0.151.

Für das gesamte Probenkollektiv der 415 Seren konnte eine schwache, dennoch hochsignifikante Korrelation zwischen der Höhe der OD-Werte der unbehandelten Seren und der Höhe der Absorptionsrate (die durch Absorption hervorgerufene Verringerung der OD (%) im absorbierten Serum) nachgewiesen werden ( $r = -0,430$ ,  $p < 0,001$ , Abbildung 3). Für die anhand der Wb.-Reaktionsmuster definierten Wb.-Gruppen 1-4 betrugen die Absorptionsraten 35,9%, 35,2%, 30,1% und 27,9%, wobei die OD-Werte der absorbierten Seren durchgängig signifikant niedriger waren als die

zugehörigen OD-Werte der unbehandelten Seren ( $p < 0.001$ , Mann-Whitney Rangsummentest). Durch Absorption konnten die OD-Werte des positiven Kontrollserums im Mittel um 8.1% verringert werden. In den Wb.-Gruppen 1 und 2 waren die Mediane der Absorptionsrate signifikant höher als in Gruppe 4 ( $p < 0.01$ , Kruskal-Wallis-Test). Zwischen den Wb.-Gruppen 3 und 4 waren die entsprechenden Medianen nicht signifikant verschieden. Bei Seren mit geringeren OD-Werten, insbesondere Seren mit grenzwertigen oder schwach positiven ELISA-Reaktionen bewirkte die Absorption eine signifikante Verringerung der OD-Werte, ein Hinweis darauf, dass die gemessenen ELISA-Reaktivitäten nur partiell auf einer *B. burgdorferi*-Infektion beruhen.

Die weitergehende Analyse eines Kollektivs von 60 willkürlich ausgewählten Seren mit Leptospirenantikörpern in MAT-Titern von 1:100 bis 1:800 ergab eine signifikante Korrelation zwischen der Absorptionsrate und der Höhe der MAT-Titer (Abbildung 4). Im ELISA unter Verwendung eines *B. burgdorferi* Ganzzell-Lysates als Antigen ist die Höhe der OD-Werte somit teilweise Folge von Interferenzen zwischen kreuzreagierenden Antikörpern etwa gegen Leptospiren und *B. burgdorferi*-spezifischen Antikörpern.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, führte die Serumabsorption zu einem signifikanten Anstieg der Rate an ELISA-negativen Reagenten von 46,0% auf 60,5% ( $p < 0.001$ , Exakter Test nach Fisher). Ursächlich hierfür ist im wesentlichen, dass in den Wb.-Gruppen 1 und 2 (Seren ohne *B. burgdorferi*-spezifische Wb.-Seroreaktivität) die Serumabsorption signifikante Veränderungen der Relation von ELISA negativen und ELISA positive Reagenten bewirkt hat. In der nachfolgenden Analyse von ELISA und Wb.-Resultaten werden daher nur die OD-Werte der absorbierten Seren berücksichtigt.

### 3.4 Vergleich von Western blot und ELISA

#### **Western blot Profil 1**

In den 118 Seren der Wb.-Gruppe 1 war keine *B. burgdorferi*-spezifische Reaktivität nachweisbar. Die OD-Werte der absorbierten Seren waren im Mittel um 35,9% und damit signifikant niedriger als die OD-Werte der unbehandelten Seren ( $p < 0.001$ , Kruskal-Wallis-Test). Der Anteil der ELISA positiven Reagenten verringerte sich signifikant von 33,9% in den unbehandelten Seren auf 7,6% in den absorbierten Seren ( $p < 0,001$ , Exakter Test nach Fisher, Tabelle 1). Das Fehlen jeglicher Wb.-Reaktivität ist ein Hinweis auf das Vorliegen falsch-positiver ELISA-Reaktionen in diesen Seren.

#### **Western blot Profil 2**

Für die Reaktionsmuster der 121 Seren aus der Wb.-Gruppe 2 waren Reaktionen mit den bekannt kreuzreagierenden und unspezifischen Partialantigenen charakteristisch (41 kDa Flagellin: 96,7%, hsp60: 28,1%). Die OD-Werte der Seren aus Wb.-Gruppe 2 waren signifikant höher als die der Wb.-Gruppe 1 ( $p < 0,001$ , Kruskal-Wallis-Test). Serumabsorption hatte einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Relation von ELISA-negativen und -positiven Reagenten: Durch Absorption erhöhte sich der Anteil der ELISA-negativen Reagenten von 42,2% auf 73,5% ( $p < 0,001$ , Exakter Test nach Fisher, Tabelle 1).

#### **Western blot Profil 3**

Die 94 Seren der Wb.-Gruppe 3 wurden als verdächtig eingeordnet, da sie mit jeweils einem der *B. burgdorferi*-spezifischen Partialantigene aus dem Wb.-

relevanten Antigenspektrum reagierten. Auffällig ist die mit 53 Seren (56,4%) hohe Rate an Reagenten mit dem p83/100-Antigen. Daneben fanden sich häufig Reaktionen mit dem 41 kDa Flagellin oder den hsp60/hsp75-Hitzeschockproteinen. Die ELISA-OD-Werte der Wb.-Gruppe 3 waren signifikant höher als die der Wb.-Gruppe 1 ( $p < 0,001$ , Kruskal-Wallis-Test), unterschieden sich jedoch nicht von den OD-Werten der Wb.-Gruppe 2. Insgesamt sprechen die Wb.-Reaktionsmuster der Seren aus Wb.-Gruppe 3 für das Vorliegen von *B. burgdorferi*-spezifischen Antikörpern. Obwohl die Absorption eine signifikante Verringerung der OD-Werte bewirkte, blieb sie ohne Einfluss auf das Verhältnis von ELISA-negativen und ELISA-positiven Reagenten (Tabelle 1).

#### **Western blot Profil 4**

Die 82 Seren der Wb.-Gruppe 4 wurden im Wb. als positiv bewertet, da sie mit mindestens zwei *B. burgdorferi*-spezifischen Partialantigenen reagierten. Insgesamt betrug der Anteil der ELISA-positiven Reagenten in dieser Gruppe 82,9%, darunter insgesamt 14 Seren (17,1%) mit deutlich falsch-negativen ELISA-Reaktionen. Auffällig an Wb.-Gruppe 4 ist der mit 62 Seren (75,6%) hohe Anteil an Reagenten mit dem p83/100-Antigen. Dieser Anteil der p83/100-positiven Reagenten ist signifikant höher als in Wb.-Gruppe 3 ( $p < 0,05$ , Exakter Test nach Fisher). Die OD-Werte der Wb.-Gruppe 4 unterscheiden sich nicht signifikant von denen der Wb.-Gruppe 3, sind jedoch signifikant höher als die der Wb.-Gruppen 1 und 2 ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis-Test).

Insgesamt war die Häufigkeitsverteilung von ELISA-positiven und -negativen Reagenten in den Gruppen der Wb.-negativen (Wb.-Gruppe 1 und 2), der Wb.-verdächtigen (Wb.-Gruppe 3) und der Wb.-positiven Seren (Wb.-Gruppe 4)

signifikant verschieden ( $p < 0,01$ , *Chi-Quadrat-Test*); ein Hinweis darauf, dass positive ELISA-Reaktionen mit positiven Wb.-Reaktionen korreliert sind.

### 3.5 Serologische Untersuchungen an Stuten und Fohlen

Die Seren der 54 Stuten wurden analog der Wb.-Profile der vorgängig untersuchten 415 Seren in vier Gruppen eingeteilt (Wb.-Gruppe 1,  $n=16$ , 29,6%, Gruppe 2,  $n=15$ , 27,8%, Gruppe 3,  $n=9$ , 16,7%, Gruppe 4,  $n=14$ , 25,9%). Nur bei den Stuten der Wb.-Gruppe 4 waren *B. burgdorferi*-spezifische positive ELISA- und Wb.-Reaktionen des Kolostrums und der am 1. Lebenstag (nach Kolostrumaufnahme) entnommenen Fohlenserum nachweisbar. Nach vollständiger Analyse der Stutenserum, der Kolostrumproben und der Fohlenserum (1. Lebenstag, 6. Lebensmonat) konnten innerhalb der Wb.-Gruppe 4 der Stuten-/Fohlenpaare drei Untergruppen unterschieden werden (A-C; Abbildung 5). ELISA und Wb. der 6 Stuten-/Fohlenpaare der Gruppe A zeigen den Nachweis von *B. burgdorferi*-spezifischen Antikörpern im Serum und Kolostrum der Stuten sowie im Fohlenserum vom 1. Lebenstag an. In den Fohlenserum aus dem 6. Lebensmonat lagen die OD-Werte deutlich unter dem cut-off und im Wb. waren nur schwache Reaktionen mit *B. burgdorferi*-spezifischen Partialantigenen nachweisbar. Beispiele dieser Wb.-Reaktionen in Abbildung 6 zeigen, dass die Reaktionsmuster innerhalb eines Stuten-/Fohlenpaares weitgehend übereinstimmen. In Gruppe B (4 Stuten-/Fohlenpaare), waren im Serum und Kolostrum der Stuten hohe ELISA-OD-Werte in Assoziation mit *B. burgdorferi*-spezifischen Wb.-Reaktionen nachweisbar. Die Seren der Fohlen waren jedoch am 1. Lebenstag und im 6. Lebensmonat ELISA- und Wb.-negativ. Die serologischen Resultate der Stuten-/Fohlenpaare der Gruppe C ( $n=4$ ) erscheinen auf den ersten Blick inkonklusiv. Während *B. burgdorferi*-Antikörper im Blutserum der Stuten

nachweisbar sind, reagiert das Kolostrum durchgängig negativ. Demgegenüber sind in den Fohlenseren vom 1. Lebenstag *B. burgdorferi*-Antikörper nachweisbar. Allerdings sind die OD-Werte vergleichsweise niedrig; ein Hinweis darauf, dass die Antikörperkonzentrationen im Fohlenserum im Vergleich zum Stutenserum relativ niedrig sind (Abbildung 6).

#### **4 Diskussion**

Da die *B. burgdorferi*-Infektion des Pferdes weder durch den kulturellen Erregernachweis noch durch die Amplifizierung erregerspezifischer DNA definitiv nachweisbar ist, fusst die ätiologische LB.-Diagnostik nach wie vor auf serologischen Verfahren. Dabei stellt der Wb. das wichtigste Referenzverfahren dar.

An den 415 absorbierten Serumproben von Pferden zeigte sich eine schwache aber signifikante Korrelation zwischen der Höhe der ELISA-OD-Werte und der Wb.-Reaktivität, i.e. der Anzahl der reaktiven Partialantigene ( $r=0,445$ ,  $p<0,01$ ).

Gesicherte Kenntnisse über die humorale Immunantwort bei *B. burgdorferi*-infizierten Pferden, insbesondere über Seroaktivität mit bekannten *B. burgdorferi*-Partialantigenen im Wb. sind auf zwei experimentelle Studien an Ponies beschränkt (Chang et al., 2000a; Chang et al., 2005). Danach sind bei Pferden etwa 5 bis 6 Wochen nach einer *B. burgdorferi*-Infektion spezifische Antikörper im ELISA nachweisbar. Insgesamt geht diese Serokonversion mit einer eher verzögerten Wb.-Seroreaktivität mit definierten Partialantigenen etwa ab dem 3. Monat post infectionem (p.i.) einher. Im 4. Monat p.i. reagieren infizierte Tiere fast ausnahmslos mit dem sog. C6 Antigen, einem synthetischen 25-Aminosäure-Peptid aus einer hochkonservierten immunodominanten Region des *B. burgdorferi* Vls-E Lipoproteins

(Johnson et al., 2008). Insgesamt ist die im Wb. nachweisbare humorale Immunantwort bei experimentell infizierten Pferden eher schwach ausgeprägt. Im 6. bis 8. Monat p.i. finden sich deutliche Reaktionen mit höhermolekularen Antigenen (p83/100, 60, 41, 39 kDa). Demgegenüber ist die Seroreaktivität im niedermolekularen Antigenbereich auf wenige bzw. einzelne Partialantigene beschränkt. Auch andere Studien haben gezeigt, dass die eher schwache Immunantwort von Pferden etwa im Vergleich zu natürlich infizierten Hunden auf ein engeres Spektrum von antigenen *Borrelia* Proteinen beschränkt ist (Bosler et al., 1988; Dzierszecka und Kita, 2002). Bisher verfügen wir über keine gesicherten Erkenntnisse insbesondere zum Langzeitverlauf (>10 Monate Dauer) der equinen *B. burgdorferi*-Infektion (Chang et al., 2000a). Auch ist nicht sicher bekannt, ob und in wieweit die Persistenz und Reaktivierung einer *B. burgdorferi*-Infektion die humorale Immunantwort beeinflussen. Gleiches gilt bzgl. potentieller Reinfektionen, eventuell sogar mit anderen Genospezies (Bennet und Berglund, 2002; Golde et al., 1998; Müller et al., 2002). Andere beim Pferd bislang nicht untersuchte Aspekte sind die beim Menschen nachgewiesenen multiplen *B. burgdorferi*-Infektionen mit verschiedenen Genospezies (Demaerschack et al., 1995; Seinost et al., 1999).

Nach derzeitigem Kenntnisstand ist es nicht möglich, eine *B. burgdorferi*-Infektion bei Pferden durch den direkten Erregernachweis sicher nachzuweisen. Daher unterliegt die Validierung serologischer Verfahren für equine *B. burgdorferi*-Infektionen, i.e. die Bestimmung signifikanter Testkriterien wie die diagnostische Sensitivität und Spezifität, einer wesentlichen Einschränkung: es stehen keine ausreichend grossen Kollektive an Referenzseren von sicher infizierten und sicher nicht infizierten Pferden zur Verfügung. Eine Alternative, zumindest aber ein Standard zur Testetablierung, ist die Immunisierung von Pferden, die jedoch in den meisten bisherigen serologischen



Studien nicht angewendet wurde. Bei unserem initial seronegativen Pferd waren *B. burgdorferi*-spezifische ELISA und Wb. Reaktionen 14 Tage nach der initialen Immunisierung nachweisbar. Nach der Booster-Immunisierung kam es zu einer rapiden und nachhaltigen Verstärkung der *B. burgdorferi*-spezifischen Antikörperbildung. Diese war mit einer prägnanten Wb.-Seroreaktivität mit mindestens 13 *B. burgdorferi* Antigenen assoziiert. Mit den Prä- und Post-Immunisierungsseren verfügten wir somit über ein geeignetes Werkzeug für die Etablierung des ELISA und für die Anpassung des kommerziellen Immunoblot.

Es ist heute weithin akzeptiert, dass die Anwendung von ELISA und Wb. in Form einer Stufendiagnostik den spezifischen und aussagekräftigen Nachweis einer *B. burgdorferi*-Infektion ermöglicht. Primäres Ziel unserer Studie war es, an einem grösseren Kollektiv von Pferdeseren die auftretenden ELISA- und Wb.-Reaktionen in Hinblick auf eine Unterscheidung von serologisch negativen und positiven Reagenten zu kategorisieren. Das ELISA Protokoll ist eine laboreigene Standardmethode zur routinemässigen Untersuchung von Tierseren (Gerber et al., 2007, Wittenbrink et al., 1996, Speck et al., 2007). Aufgrund der lückenhaften Kenntnisse über die Wb.-Reaktionsmuster von natürlich infizierten Pferden und aufgrund der bekannten unterschiedlichen Immunreaktivitäten von *in vitro* vermehrten *B. burgdorferi*-Stämmen haben wir für unsere Wb.-Untersuchungen einen kommerziellen Test verwendet (Hauser et al., 1997, 1998). Die dadurch mögliche hohe Standardisierung ist nicht zuletzt von Bedeutung, weil der Wb. mangels anderer sensibler Verfahren des direkten Erregernachweises als wichtigste Referenzmethode gilt.

Um zwischen negativen und positiven ELISA-Reaktionen unterscheiden zu können, wurden alle 415 Seren vergleichend im ELISA und Wb. untersucht. Dabei konnten

wir bestätigen, dass auch bei Pferdeseren durch Absorption der Anteil an falsch-positiven ELISA-Reaktionen signifikant verringert werden kann (Burkot et al., 1996; Engel et al., 2000). Von insgesamt 239 Seren (Wb.-Gruppe 1 und 2), die aufgrund der Wb.-Resultate als negativ einzuordnen waren, reagierten 110 Seren (46,0%) im ELISA falsch positiv. Durch die Absorption konnte dieser Anteil signifikant auf 17,1% verringert werden. Unseren Ergebnissen zufolge beruhen solche falsch-positiven ELISA-Reaktionen zu einem erheblichen Anteil auf Leptospireninfektionen. Darüberhinaus finden sich bei Pferden Infektionen mit anderen Spirochäten, die vermutlich ebenfalls kreuzreagierende Antikörper induzieren (Shibahara et al., 2002, 2005; Hampson et al., 2006). Für den spezifischen serologischen Nachweis von *B. burgdorferi*-Infektionen beim Pferd ist der ELISA allein definitiv nicht ausreichend. Vor diesem Hintergrund muss man die Ergebnisse und Schlussfolgerungen von Seroprävalenzstudien relativieren, in denen Blutseren von Pferden lediglich im ELISA (oder dem hinsichtlich der Spezifität vergleichbaren IFT) auf Antikörper gegen Ganzzell-Antigene von *B. burgdorferi* untersucht wurden.

In Übereinstimmung mit Wormser et al. (2000) ist festzustellen, dass ELISA und Wb. nicht unabhängig sind. In unserer Studie zeigte sich dieses an der signifikanten Korrelation der ELISA-OD-Werte der absorbierten Seren mit der Anzahl der WB.-reaktiven Antigenbanden. Dennoch dürfen wir den IgG-Wb. als Bestätigungstest ansehen, da eine deutliche Unterscheidung der Seroreaktivitäten mit unspezifischen, weniger bzw. relativ spezifischen oder *B. burgdorferi*-spezifischen Partialantigenen möglich ist. Dies verdeutlichen die unterschiedlichen Wb.-Profile unserer Studie. Die Seren der Wb.-Gruppe 2 wiesen eine signifikante Verringerung der OD-Werte infolge Absorption auf. Dieses Merkmal zusammen mit den Wb.-Reaktionen, die sich auf das relativ spezifische, i.e. das bekannt kreuzreagierende 41 kDa Flagellin und - zu

einem geringeren Anteil – auf das unspezifische hsp60 beschränkten, sprechen dafür, dass die positiven ELISA-Reaktionen dieser Pferde nicht die Folge einer *B. burgdorferi*-Infektion sind.

Bei den 94 Seren mit dem Wb.-Profil 3 (22,7%) begründen die serologischen Befunde den Verdacht, dass sich die Pferde immunologisch mit *B. burgdorferi* auseinandergesetzt haben. Die ELISA-OD-Werte der Gruppe 3 sind signifikant höher als die der 118 Wb negativen Seren, unterscheiden sich aber interessanterweise nicht von denen der Gruppe 2 mit den unspezifischen Wb.-Reaktionen. Im Gegensatz zur Gruppe 2 enthält das Wb.-Profil der Gruppe-3-Seren jedoch Reaktionen mit jeweils einem spezifischen *B. burgdorferi* Antigen. Besonders häufig sind mit 56,4% Reaktionen mit dem hochspezifischen p83/100-Antigen (Hauser et al., 1997). Für den Verdacht einer *B. burgdorferi*-spezifischen Antikörperbildung spricht zudem, dass trotz Absorption die Relation von ELISA negativen und -positiven Seren etwa unverändert bei 1:1 blieb, der ELISA also auch in dieser Hinsicht verdächtige Ergebnisse anzeigt. Es muss offenbleiben, ob die Seroreaktivitäten der Wb.-Gruppe 3 Residuen abortiver Infektionen sind oder die Anbildung einer spezifischen humoralen Immunantwort anzeigen.

Letzteres Merkmal, die *B. burgdorferi*-spezifische humorale Immunantwort, liegt unseres Erachtens sicher bei den 82 Seren Wb.-Gruppe 4 vor, die im Wb. gemäss den testinternen Auswertungskriterien eindeutig als seropositiv einzuordnen waren. Hervorzuheben ist der mit 75,6% hohe Anteil an Reagenten mit dem p83/100-Antigen. Den Ergebnissen der experimentellen Infektionen von Pferden zufolge sind Antikörper gegen p83/100 etwa vier Monate p.i. nachweisbar (Chang et al. 2000a). Für die Beurteilung der diagnostischen Wertigkeit des ELISA ist relevant, dass sich die OD Werte der Wb.-positiven Seren nicht signifikant von denen der Wb.-

verdächtigen Seren (Wb.-Gruppe 3) unterscheiden. Hingegen sind sie signifikant höher als die der Wb.-negativen (Wb.-Gruppe 1) bzw. -unspezifischen Seren (Wb.-Gruppe 2). Insgesamt finden sich also bei 82 der 415 untersuchten Pferde (19,8%) valide serologische Indizien für eine *B. burgdorferi*-Infektion. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme klinisch gesund und die Tierbesitzer konnten keine Hinweise auf frühere Erkrankungen mit den in der Literatur postulierten LB.-Symptomen geben (Butler et al., 2005). Daher sprechen unsere Befunde in Übereinstimmung mit anderen dafür, dass *B. burgdorferi*-Infektionen des Pferdes überwiegend klinisch inapparent verlaufen. Vor dem Hintergrund der vielfältigen serologischen Reaktionsmuster und der hohen Seroprävalenz können wir bestätigen, dass die serologische Untersuchung an Einzelproben für die ätiologische Klärung des LB.-Verdachtes bei Pferden gänzlich ungeeignet ist.

Ein weiterer Beleg dafür, dass bei den Tieren mit einem serologischen Reaktionsmuster der Wb.-Gruppe 4 tatsächlich eine *B. burgdorferi*-Infektion vorliegt, sind die Ergebnisse der Untersuchungen an Stuten-/Fohlenpaaren. *B. burgdorferi*-spezifische positive Wb.-Reaktionen im Kolostrum und im Serum von neugeborenen Fohlen nach Kolostrumaufnahme waren ausschliesslich bei Stuten nachweisbar, deren Blutseren ebenfalls positive Wb.-Reaktionen zeigten. Bei Fohlen mit normaler Kolostrumversorgung fallen die Serum-IgG-Konzentrationen zwischen dem 1. und 2. Lebensmonat auf ein Minimum ab. Im 6. Lebensmonat sind maternale Antikörper im Blutserum dieser Fohlen nicht mehr nachweisbar (Jeffcott, 1975, Wilson et al., 2001). Auch in unserer Studie waren in den Seren der etwa 6-Monate alten Fohlen keine bzw. eine nur noch sehr schwache *B. burgdorferi*-spezifische Wb.-Reaktivität nachweisbar. Bemerkenswert ist, dass bei keinem der am Tag 1 seronegativen Fohlen in den folgenden 6 Monaten eine Serokonversion auftrat, so dass wir davon

ausgehen, dass es in diesem Probenkollektiv keine initialen *B. burgdorferi*-Infektionen gegeben hat. Ein Teil der Resultate an Kolostrum, Stuten- und Fohlenseren ist nicht schlüssig. Der Grund dafür ist unseres Erachtens, dass insbesondere die entsprechenden Kolostrumproben bzw. die Serumproben der neugeborenen Fohlen nicht zum optimalen Zeitpunkt, d.h. erst gegen Ende des 1. Lebenstages bzw. erst am 2. Lebenstag genommen werden konnten. Es ist bekannt, dass der passive Transfer kolostraler Antikörper durch zahlreiche Faktoren wie das Volumen des aufgenommenen Kolostrums, der Zeitpunkt der Aufnahme oder auch der IgG-Gehalt des Kolostrums massgeblich beeinflusst wird. Beim neugeborenen Fohlen nimmt die Rate der intestinalen Immunoglobulin-Absorption linear ab und kommt innerhalb von 24 h vollständig zum Erliegen. Diesen Umständen sind unseres Erachtens die in Teilen negativen serologischen Befunde an Kolostrum und Blutseren von neugeborenen Fohlen von blutserologisch positiven Stuten zuzuschreiben. Ob Fohlen mit maternalen *B. burgdorferi*-Antikörpern in den ersten Lebenswochen gegen eine Infektion mit *B. burgdorferi* geschützt sind, ist bisher nicht bekannt.

## 5 Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1. Ergebnisse der Untersuchung von 415 Pferdeseren im *Borrelia burgdorferi*-ELISA.

Wb.-Gruppe <sup>1</sup>	Seren insgesamt		<i>B. burgdorferi</i> ELISA								p Wert <sup>4</sup>
			unbehandelte Seren				absorbierte Seren				
			negativ <sup>2</sup>		positiv <sup>2</sup>		negativ <sup>3</sup>		positiv <sup>3</sup>		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%n	
1	118	28.4	78	66.1	40	33.9	109	92.4	9	7.6	<0.001
2	121	29.2	51	42.1	70	57.9	89	73.6	32	26.4	<0.001
3	94	22.6	43	45.7	51	54.3	39	41.5	55	58.5	ns.
4	82	19.8	19	23.2	63	76.8	14	17.1	68	82.9	ns.
Insgesamt	415	100.0	191	46.0	224	54.0	251	60.5	164	39.5	<0.001

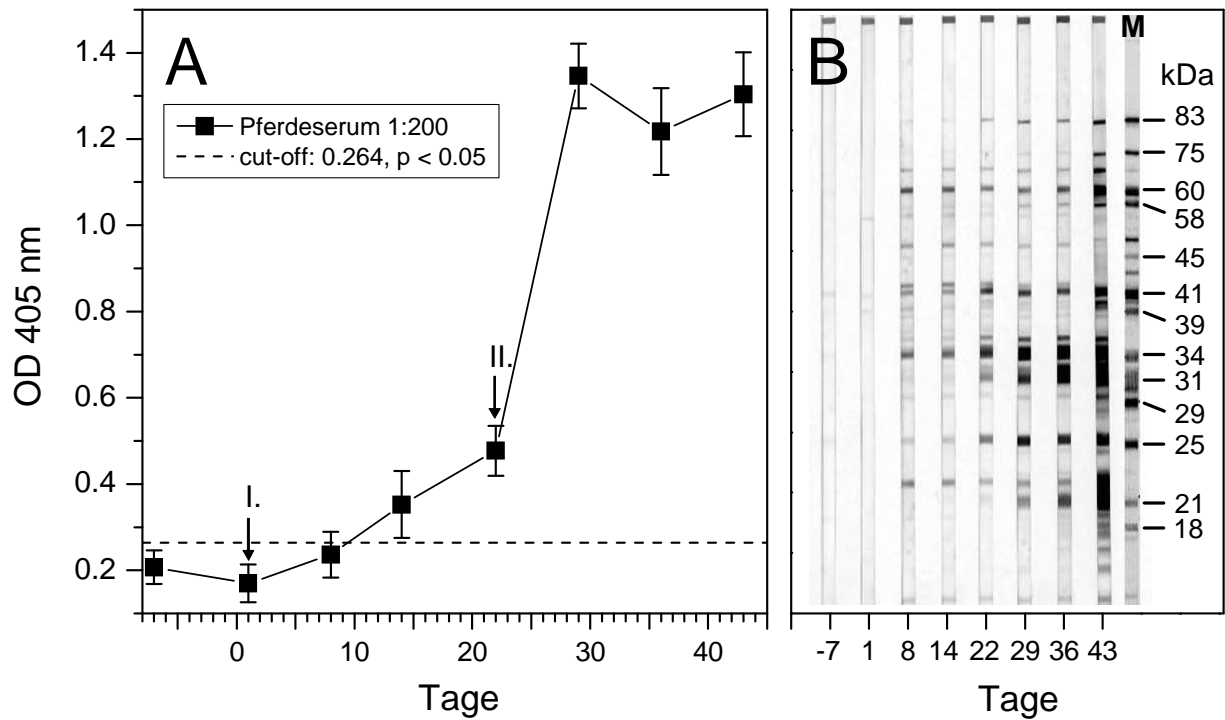
<sup>1</sup> Wb.-Reaktionsmuster gemäss Abbildung 2. Die Details sind in den Abschnitten 3.2 und 3.4 beschrieben.

<sup>2</sup> cut-off 0.273.

<sup>3</sup> cut-off 0.151.

<sup>4</sup> Unterschiede der Häufigkeitsverteilung von negativen und positiven ELISA-Reaktionen in unbehandelten und absorbierten Seren wurden im Exakten Fisher Test geprüft; p-Werte <0.05 wurden als signifikant angesehen (ns., nicht signifikant).

Abbildung 1. Immunisierung eines Pferdes mit *Borrelia burgdorferi*.

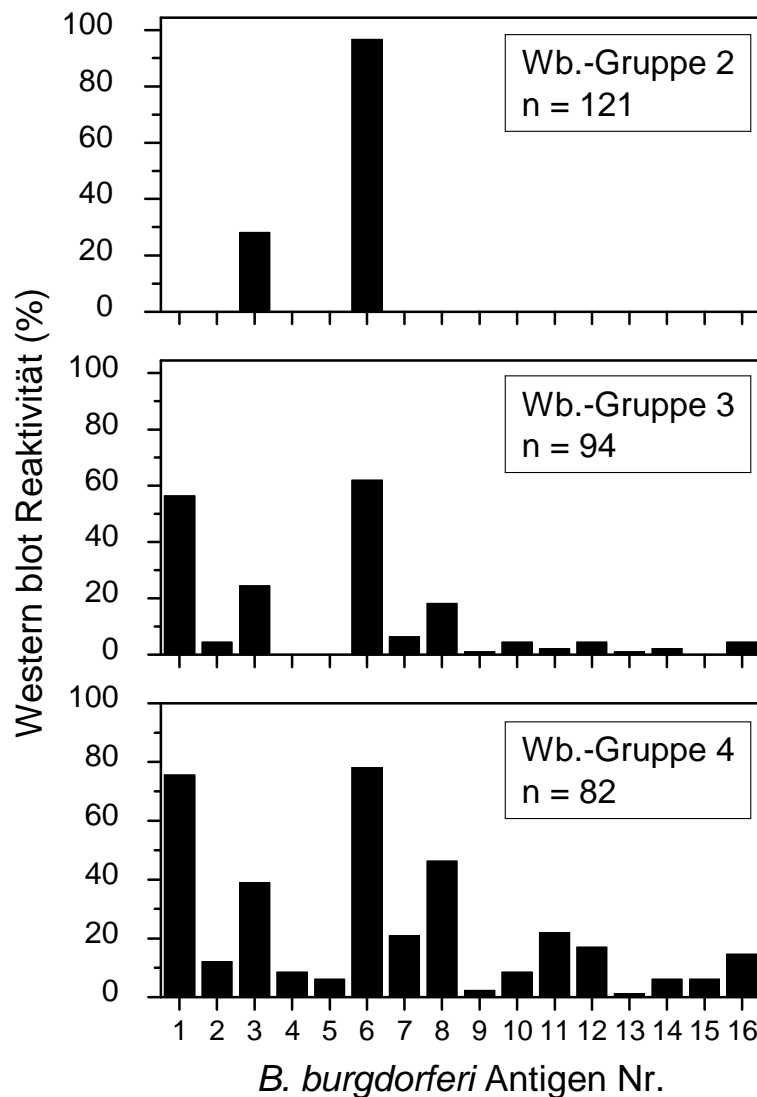


A: Bestimmung der IgG-Antikörper-Konzentrationen im ELISA vor und nach der Erstimmunisierung (I) bzw. nach der Booster-Immunisierung.

B: Analyse der humoralen Immunantwort im Western blot.

Die Details der Immunisierung und der serologischen Auswertung sind in Abschnitten 2.3 bzw. 3.1 beschrieben.

Abbildung 2. Humorale Immunantwort von gesunden Pferden gegen *Borrelia burgdorferi*.



Die Analyse der humoralen Immunantwort erfolgte im Western blot wie in den Abschnitten 2.4 und 3.2 beschrieben.

Die *B. burgdorferi*-Antigene sind mit fortlaufenden Nr. auf der Abszisse angegeben: 1, p83/100; 2, 75 kDa Hsp; 3, 60 kDa Hsp; 4, 58 kDa Protein; 5, 45 kDa Protein; 6, 41 kDa Flagellin; 7, 39 kDa BmpA; 8, 34 kDa OspB; 9, 31 kDa OspA; 10, 30 kDa Protein; 11, 29 kDa OspD; 12, 25 kDa OspC; 13, 22 kDa proein; 14, 21 kDa Protein mit Homologien zum OspC; 15, 19 kDa OspE; 16, 18 kDa p17.



Abbildung 3. ELISA zur Untersuchung der humoralen Immunantwort von gesunden Pferden gegen *Borrelia burgdorferi*: Korrelation zwischen den OD-Werten der unbehandelten Seren und der durch Absorption induzierten Reduktion der OD-Werte.

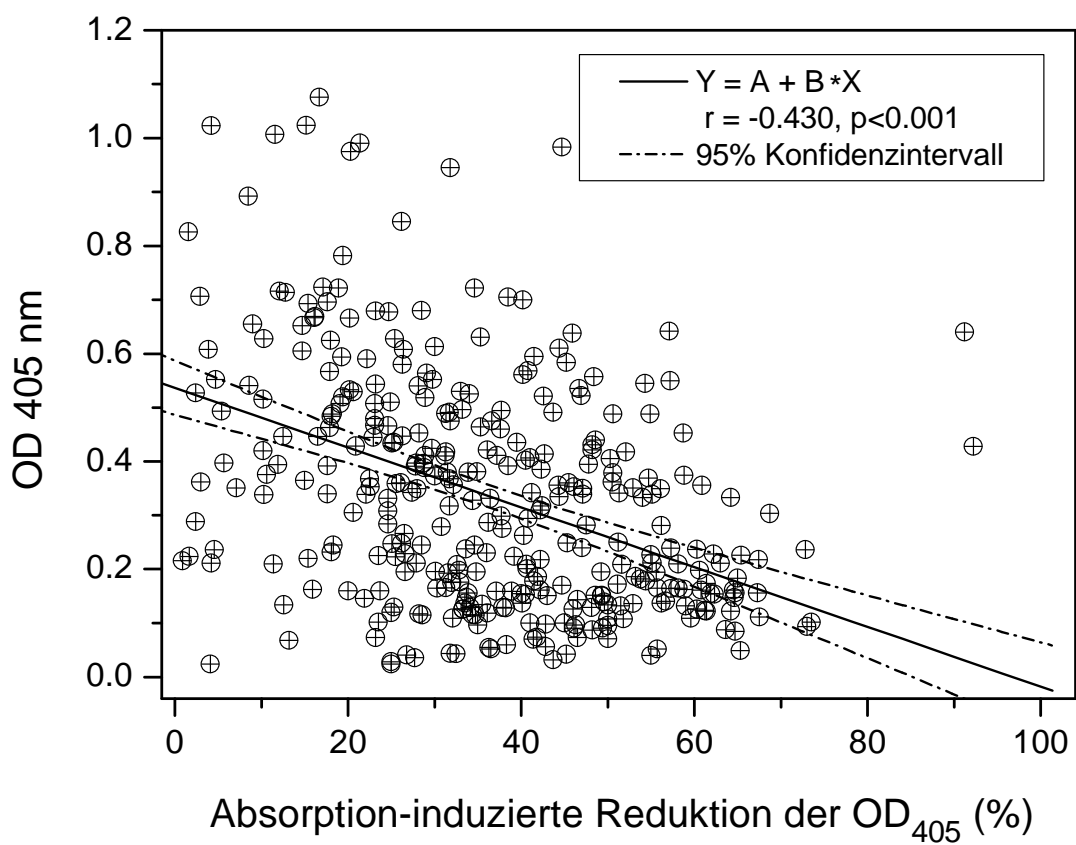


Abbildung 4. ELISA zur Untersuchung der humoralen Immunantwort von gesunden Pferden gegen *Borrelia burgdorferi*: Korrelation zwischen den MAT-Titern von Leptospirenantikörpern und der durch Absorption induzierten Reduktion der OD-Werte.

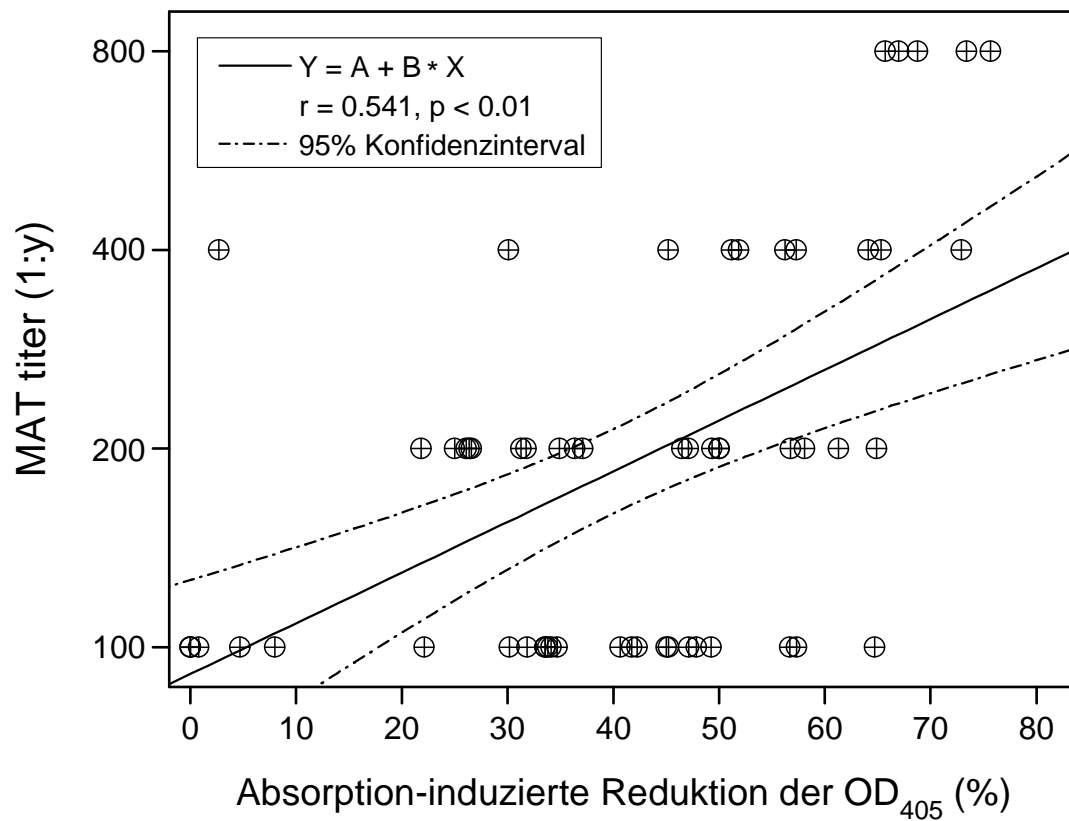
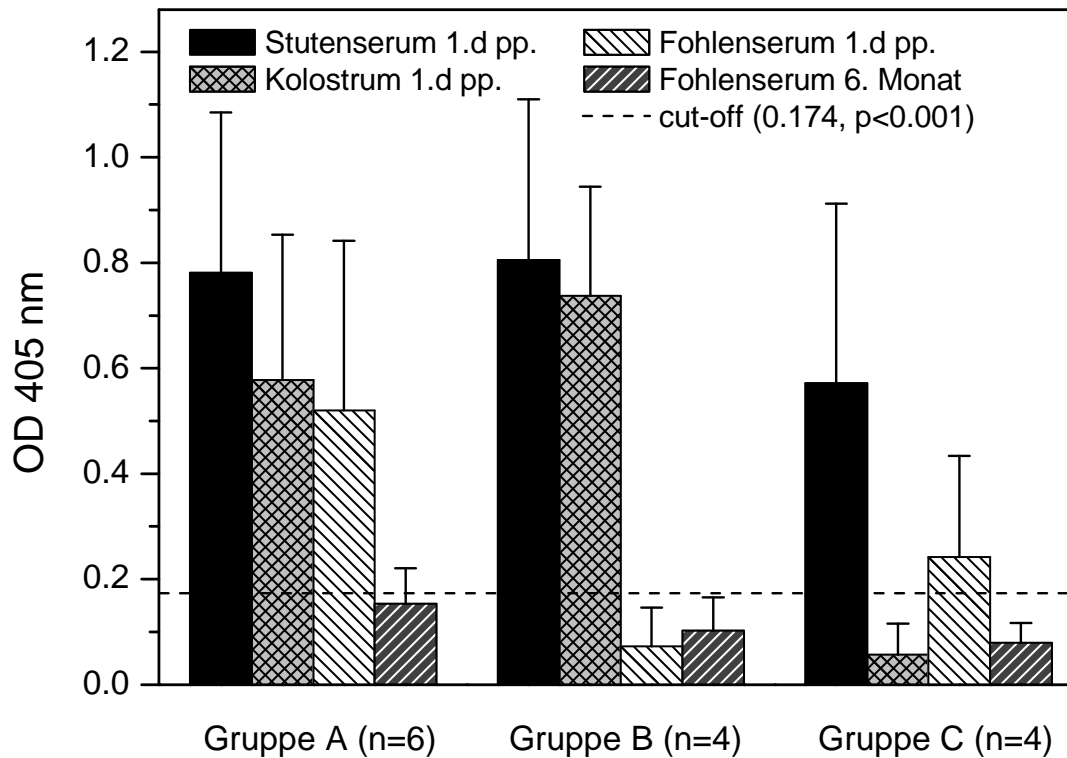
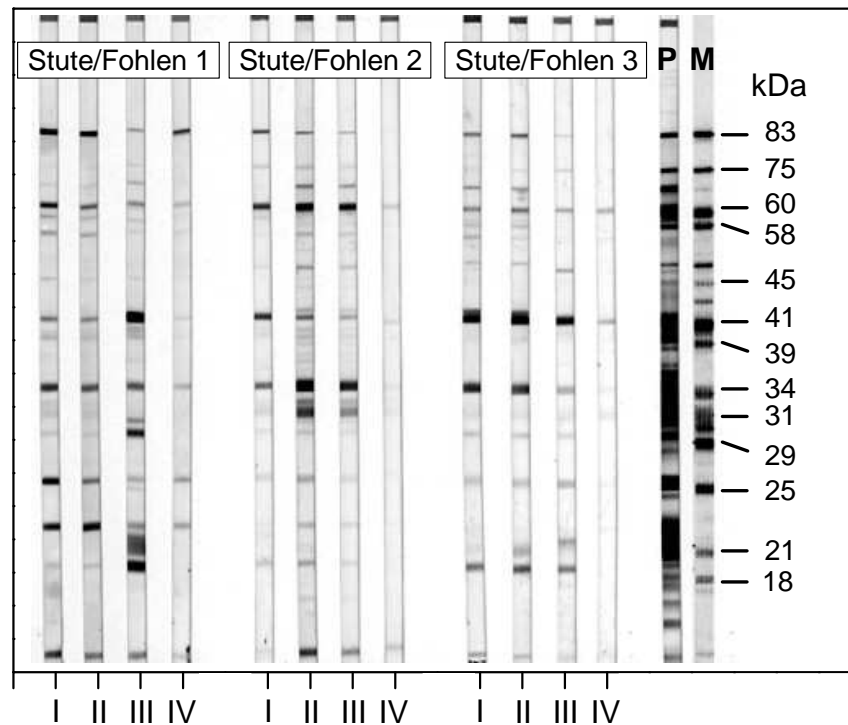


Abbildung 5. Bestimmung von *Borrelia burgdorferi* IgG-Antikörpern im Blutserum und Kolostrum von Stuten sowie im Blutserum von Fohlen im ELISA.



Die Antikörperkonzentrationen sind als arithmetischer Mittelwert (Säulen) plus Standardabweichung (Fehlerbalken) angegeben.

Abbildung 6. Bestimmung von *Borrelia burgdorferi* IgG-Antikörpern im Blutserum und Kolostrum von Stuten sowie im Blutserum von Fohlen im Western blot.



Stute/Fohlen-Paare 1-3, Western blot Resultate von drei verschiedenen Stute/Fohlen-Paare 1-3. I, Stutenserum; II, Kolostrum; III, Fohlenserum. Die Proben I-III wurden am 1. Tag nach Abfohlung entnommen. IV, Fohlenserum aus 6. Lebensmonat. P, Positivkontrolle. M, testinterner Standard zur Bestimmung reaktiver Antigenbanden.

## 6 Literatur

Barbour AG: Isolation and Cultivation of Lyme Disease Spirochetes. *Yale J Biol Med* 1984, 57: 521-525.

Barbour AG: Biological and social determinants of the Lyme disease problem. *Inf Agents Dis* 1992, 1: 50-61.

Bennet L, Berglund J: Reinfection with Lyme borreliosis: a retrospective follow-up study in southern Sweden. *Scand J Infect Dis* 2002, 34: 183-186.

Bosler EM, Cohen DP, Schulze TL, Olsen C, Bernhard W, Lissman B: Host responses to *Borrelia burgdorferi* in dogs and horses. *Ann NY Acad Sci* 1988, 539: 221-234.

Burkot TR, Schriefer ME, Larsen SA: Cross-reactivity to *Borrelia burgdorferi* proteins in serum samples from residents of a tropical country nonendemic for Lyme disease. *J Infect Dis* 1996, 175: 466-469.

Butler CM, Houwers DJ, Jongejan F, Van der Kolk JH: *Borrelia burgdorferi* infections with special reference to horses. A review. *Vet Q* 2005, 27: 146-156.

Chan DW, Perlstein MT: Immunoassay: A practical Guide. Academic Press, Inc., San Diego, USA, 1987, S. 53-67.

Chang YF, Novosol V, McDonough SP, Chang CF, Jacobson RH, Divers T, Quimby FW, Shin S, Lein DH: Experimental infection of ponies with *Borrelia burgdorferi* by exposure to ixodid ticks. *Vet Pathol* 2000 a, 37: 68-76.

Chang YF, Novosol V, McDonough SP, Chang CF, Jacobson RH, Divers T, Quimby FW, Shin S, Lein DH: Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A (rOspA) in horses. *Vaccine* 2000 b, 18: 540-548.

Chang YF, Ku YW, Chang CF, Chang CD, McDonough SP, Divers T, Pough M, Torres A: Antibiotic treatment of experimentally *Borrelia burgdorferi*-infected ponies. *Vet Microbiol* 2005, 107: 285-294.

Cohen D, Bosler EM, Bernhard W, Meirs D, Eisner R, Schulze T L: Epidemiologic studies of Lyme disease in horses and their public health significance. *Ann N Y Acad Sc* 1988, 539: 244-257.

Crowther JR: Validation of diagnostic tests for infectious diseases. In: *Methods in Molecular Biology Vol. 149. The ELISA Guidebook*, Humana Press Inc., Totowa, NJ 2001: 301-345.

Demaerschalck I, Messaoud AB, De Kesel M, Hoyois B, Lobet Y, Hoet P, Bigaignon G, Bollen A, Godfroid E: Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J Clin Microbiol* 1995, 33: 602-608.

Dzierzecka M, Kita J: The use of chosen serological diagnostic methods in Lyme disease in horses. Part II. Western blot. *Polish J Vet Sci* 2002, 5: 79-84.

Egenvall A, Franzen P, Gunnarsson A, Engvall EO, Vagsholm I, Wikström UB, Artursson K: Cross-sectional study of the seroprevalence to *Borrelia burgdorferi* sensu lato and granulocytic *Ehrlichia* spp. and demographic, clinical and tick-exposure factors in Swedish horses. *Prev Vet Med* 2001, 49: 191-208.

Eisen L, Eisen RJ, Chang CC, Mun J, Lane RS: Acarologic risk of exposure to *Borrelia burgdorferi* spirochetes: long-term evaluations in north-western California, with implications for Lyme borreliosis risk-assessment models. *Med Vet Entomol* 2004, 18: 38-49.

Engel W, Vogt A, Batsford SR: Validity of prior absorption of serum samples with Reiter's spirochetes in serological diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000, 19: 960-963.

Fahrer H, Sauvain MJ, Zhioua E, Van Hoecke C, Gern LE: 1998: Longterm survey (7 years) in a population at risk for Lyme borreliosis: What happens to the seropositive individuals? *Europ J Epidemiol* 1998, 14: 117-123.

Gall Y, Pfister K: Survey on the subject of equine Lyme borreliosis. *Int J Med Microbiol* 2006, S1, 296: 274-279.

Gerber B, Eichenberger S, Wittenbrink MM, Reusch CE: Increased prevalence of *Borrelia burgdorferi* infections in Bernese Mountain dogs: a possible breed predisposition. *BMC Vet Res* 2007, 3:15.

Gerhards H, Wollanke B: Antikörpertiter gegen Borrelien bei Pferden im Serum und im Auge und Vorkommen der equinen rezidivierenden Uveitis. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 1996, 109: 273-278.

Golde WT, Robinson-Dunn B, Stobierski MG, Dykhuizen D, Wan IN, Carlson V, Stiefel H, Shiflett S, Campbell GI: Culture-confirmed reinfection of a person with different strains of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *J Clin Microbiol* 1998, 36: 1015-1019.

Hampson DJ, Lester GD, Phillips ND: Isolation of *Brachyspira pilosicoli* from weanling horses with chronic diarrhoea. *Vet Rec* 2006, 158: 661-662.

Hauser U, Lehnert G, Lobentanzer R, Wilske B: Interpretation criteria for standardized Western blots for three European genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J Clin Microbiol* 1997, 35: 1433-1444.

Hauser U, Krahel H, Peters H, Fingelre V, Wilske B: Impact of strain heterogeneity on Lyme disease serology in Europe: comparison of Enzyme-linked immunosorbent assays using different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J Clin Microbiol* 1998, 36: 427-436.

Jeffcott LB: The transfer of passive immunity to the foal and its relation to immune status after birth. *J Reprod Fert Suppl* 1975, 23: 727-733.

Johnson AL, Divers TJ, Chang YF: Validation of an in-clinic enzyme-linked immunosorbent assay kit for diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infection in horses. *J Vet Diagn Invest* 2008, 20: 321-324.

Käsbohrer A, Schönberg A: Serologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Borrelia burgdorferi* bei Haustieren in Berlin (West). *Berl Münch Tierärztl Wschr* 1990, 103: 374-378.

Kurtenbach K, Hanincová K, Tsao JI, Margos G, Fish D, Ogden NH: Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nature Rev Microbiol* 2006, 4: 660-669.

Levy SA, Magnarelli LA: Relationship between development of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and subsequent development of limb/joint borreliosis. *J Amer Vet Med Assoc* 1992, 200: 344-347.

Liebisch G, Assmann G, Liebisch A: Infektion mit *Borrelia burgdorferi* s.l. als Krankheitserreger der Lyme-Borreliose bei Pferden in Deutschland. *Prakt Tierarzt* 1999, 80: 498-516.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 19: 265-275.

Manion TB, Khan MI, Dinger J, Bushmich SL: Viable *Borrelia burgdorferi* in the urine of two clinically normal horses. *J Vet Diagn Invest* 1998 a, 10: 196-199.

Manion TB, Bushmich SL, Mittel L, Laurendeau M, Werner H, Reilly M: Lyme Disease in horses: Serological and antigen testing differences. *AAEP Proceedings* 1998 b, 44: 144-145.

Müller I, Khanakah G, Kundi M, Stanek G: Horses and *Borrelia*: Immunoblot patterns with five *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains and sera from horses of various stud farms in Austria and from the Spanish riding school in Vienna. *Int J Med Microbiol* 2002, 291: S 33, 80-87.

OIE: Leptospirosis. In: *Manual of Diagnostic Tests and vaccines for Terrestrial animals Chapter 2.2.4.*, 2006, [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00043.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00043.htm).

Schönert S, Gall Y, Grabner A: Lyme borreliosis in the horse – test evaluation and case report of a pony with meningitis. *Tieraerztl Praxis* 2008, S1, 36: 49-53.

Seinost G, Golde WT, Berger BW, Dunn JJ, Dan Q, Dunkin DS, Dykhuizen DE, Luft BJ, Dattwyler RJ: Infection with multiple strains of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in patients with Lyme disease. *Arch Dermatol* 1999, 135: 1329-1333.

Shibahara T, Kuwano A, Ueno T, Anzai T, Kuwamoto Y, Sato H, Maed T, Ishikawa Y, Kadota K: Intestinal spirochetosis in a 21-months-old thoroughbred colt. *J Vet Med Sci* 2002, 64: 633-636.

Shibahara T, Kuwano A, Ueno T, Katayama Y, Ohya T, Taharaguchi S, Yamamoto S, Umemura T, Ishikawa Y, Kadota K: Immunohistochemical and ultrastructural detection of intestinal spirochetes in thoroughbred horses. *J Vet Diagn Invest* 2005, 17: 145-150.

Speck S, Reiner B, Streich WJ, Reusch C, Wittenbrink MM: Canine borreliosis: a laboratory diagnostic trial. *Vet Microbiol* 2007, 120: 132-141.



Tijssen P: Practice and theory of enzyme immunoassays. In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Vol. 15*. Edited by Burdon RH, van Knippenberg PH. Elsevier, 1985, 385-390.

Venner M, Deegen E: Interpretation of antibody titers against *Borrelia burgdorferi* in the horse in consideration of the state of knowledge in human Lyme Borreliosis – a review. [Article in German]. *Pferdeheilkunde* 1996, 12: 865-873.

Voller A, Bidwell D: Enzyme-linked immunosorbent assay. In: Rose NR, Friedmann H, Fahey JL (Hrsg.): *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 1986, 3. Aufl., ASM Press, Washington, DC, 99-109.

Wang G, Van Dam AP, Schwartz I, Dankert J: Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1999, 12: 633-653.

Wilske B: Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis. *Annals of Medicine* 2005, 37: 568-579.

Wilson WD, Milhalyi JE, Hussey S, Lunn DP: Passive transfer of maternal immunoglobulin isotype antibodies against tetanus and influenza and their effect on the response of foals to vaccination. *Equine Vet J* 2001, 33: 644-650.

Wittenbrink MM, Failing K, Krauss H: Enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs. The impact of serum absorption with homologous and heterologous bacteria. *Vet Microbiol* 1996, 48: 257-268.

Wormser GP, Carbonaro C, Miller S, Nowakowski J, Nadelman RB, Sivak S, Agüero-Rosenfeld ME: A limitation of 2-stage serological testing for Lyme disease: Enzyme-linked immunoassay and immunoblot assay are not independent tests. *Clin Infect Dis* 2000, 30: 545-548.

## **Danksagung**

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. Max M. Wittenbrink, Direktor des Institutes für Veterinärbakteriologie der Universität Zürich, für die freundliche Überlassung des interessanten Themas und die gewährte Unterstützung und Beratung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Herrn PD. Dr. Ludwig Hölzle, Anja Hamburger und allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Veterinärbakteriologie der Universität Zürich für ihre Hilfe bei verschiedenen Fragestellungen und Laborarbeiten.

Meinem früheren Chef Herrn Dr. Klaus Zimmermann, praktischer Tierarzt in Möttingen, danke ich herzlich für die tatkräftige Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.